

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-509592

(43) 公表日 平成10年(1998) 9月22日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 5/08

C 1 2 N 5/00

E

A 6 1 K 31/20

A 6 1 K 31/20

38/27

A A A

48/00

48/00

37/36

A A A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁)

(21) 出願番号

特願平8-515600

(86) (22) 出願日

平成7年(1995)11月14日

(85) 翻訳文提出日

平成9年(1997)5月14日

(86) 国際出願番号

P C T / C A 9 5 / 0 0 6 3 7

(87) 国際公開番号

W O 9 6 / 1 5 2 2 6

(87) 国際公開日

平成8年(1996)5月23日

(31) 優先権主張番号

0 8 / 3 3 8 , 7 3 0

(32) 優先日

1994年11月14日

(33) 優先権主張国

米国 (U S)

(71) 出願人

ニューロスフィアーズ ホウルディングス  
リミテッド

カナダ アルバータ ティ2エヌ 4エヌ  
1 カルガリー ノースウェスト ホスピ  
タル ドライヴ 3330 ヘリテージ メデ  
ィカル ビルディング 83

(72) 発明者

ワイス サミュエル

カナダ アルバータ ティ2エル 1エイ  
6 カルガリー ノースウェスト チャペ  
ル ロード 4540

(74) 代理人

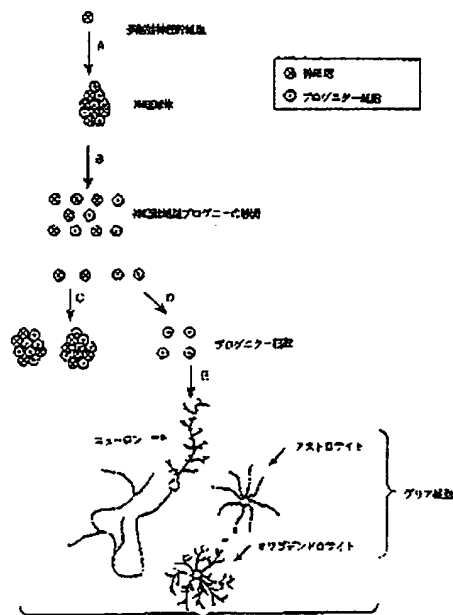
弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経幹細胞増殖調節

(57) 【要約】

本発明は、様々な生物学的因子を含む組成物を使用してインビトロおよびインビボにおいて多能性神経幹細胞の増殖を調節する方法に関する。より詳細には、本発明は、幹細胞を特定の生物学的因子またはその組み合わせに接触させることにより神経幹細胞を分離することにより産生される前駆細胞の数を調節する方法に関する。



## 【特許請求の範囲】

1. インビトロにおける多能性神経幹細胞の増殖および／または該神経幹細胞のプロゲニー(子孫、progeny)の増殖を調節する方法であって、下記の工程を含む方法。

(a)ニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトに分化し得るプロゲニーを産生することが可能な多能性神経幹細胞を少なくとも一種含む哺乳類神経組織を分離する工程、および

(b)幹細胞の増殖を誘導する増殖因子を少なくとも一種、および該多能性神経幹細胞の増殖および／または該多能性神経幹細胞のプロゲニーの増殖を調節する調節因子を含む培地内で該多能性神経幹細胞を増殖する工程。

2. 該増殖因子がEGF、アンフィレグリン、aFGF、bFGF、およびTGF  $\alpha$  からなる群から選択される、請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 該増殖因子がbFGFである、請求の範囲第1項に記載の方法。

4. 該調節因子がヘパラン硫酸、CNTF、レチノイン酸、アクチビン、インターロイキンおよびEGFからなる群から選択される、請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 該調節因子がヘパラン硫酸である、請求の範囲第3項に記載の方法。

6. 該調節因子がEGFである、請求の範囲第3項に記載の方法。

7. 該多能性神経幹細胞が哺乳類由来のものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

8. 該多能性神経幹細胞が成体ドナー由来のものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

9. 該幹細胞がヒト由来のものである、請求の範囲第1項に記載の方法。

10. 該幹細胞が神経学的疾患を患うヒト由来のものである、請求の範囲第8項に記載の方法。

11. 患者のCNSにおける神経幹細胞の増殖を調節するための治療組成物であって、治療上有効量の神経幹細胞調節因子を含むことを特徴とする治療組成物。

12. 該調節因子が神経幹細胞の増殖を阻害する、請求の範囲第11項に記載の組成物。

13. 該調節因子が、BMP-2、CNTF、レチノイン酸、TGF- $\beta$  族およびMIP族のメン

パー、並びにEGFおよびFGF受および容体に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドからなる群から選択される、請求の範囲第12項に記載の組成物。

14. 該調節因子がBMP-2である、請求の範囲第13項に記載の組成物。

15. 脳または脊髄傷害を受けた患者における瘢痕組織形成を阻害するための、請求の範囲第12～14項のいずれか一項に記載の組成物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 神経幹細胞増殖調節

## 本発明の背景

血液細胞を与える骨髓のような活性に分裂する組織内には、幹細胞として知られる特別な細胞が存在する。幹細胞を識別する決定的な性質は、自己再生を行う能力または自己を増大する能力である。幹細胞のもっとも単純な定義は、自己保存能を有する細胞という定義である。Potten and Loeffler[Development, 110:1001(1990)]らによる幹細胞のより厳格な（しかしより単純な）定義は、a)増殖、b)自己保存、c)より多数の分化した機能プロゲニー（子孫、progeny）の生産、d)障害を受けた組織の再生、およびe)これらのオプションを使用する際の柔軟性、を有する未分化の細胞というものである。

幹細胞は分化し、前駆細胞として知られるプロゲニーを産生する。前駆細胞は、新しい幹細胞およびプロゲニター細胞（前駆細胞、progenitor cell）を含む。新しい幹細胞は、再度分裂することが可能であり、さらに幹細胞（自己保存を確実にする）およびプロゲニター細胞を生産する。プロゲニター細胞は抑制された増殖を行うことができ、その全てのプロゲニーは最終的に無系分裂性機能細胞への不可逆的分化を受ける。図1は幹細胞、プロゲニター細胞および分化細胞の関係を示している。

幹細胞の役割は細胞の自然死、障害または病気により失われる細胞を再置換することである。特定の組織における幹細胞の存在は、通常高代謝回転の細胞を有する組織に関連する。しかし、この関連性は、幹細胞が高代謝回転の細胞を有さない肝臓のような組織に存在すると考えられるため、常に保持されるわけではない[Travis, Science, 259:1829(1989)]。

最もよくその性質の研究が行われた幹細胞系は、造血幹細胞である。骨髓に位置する単一造血幹細胞は、一連のプロゲニター細胞を介して全ての血液細胞系列を与える。米国特許番号5,061,620(1991年10月29日特許)には、造血幹細胞の単離、再生および使用方法が記載されている。出生前には、造血幹細胞は多くの部位（胎児卵黄嚢、骨髓、肝臓および脾臓）において活性である。出生の直前には、骨髓は造血の一次部位として作用する。肝臓および脾臓における造血幹細胞は

## 静

止し、骨髄の造血幹細胞活性が抑制されるかまたは広範囲な血液細胞の破壊が起こらない限り血液細胞の産生は再開されない。

成体哺乳類CNSの分化した細胞は、有糸分裂サイクルに入って新規神経組織を発生させる能力をほとんどまたは全く有さない—全ての神経発生は出生前および出生直後の期間において本質的に起こる。アストロサイトの制限され、かつゆっくりした代謝回転があり ([Korr et al., J. Comp. Neurol., 150: 169(1971)]、およびオリゴデンドロサイトを与えることができるプロゲニター細胞が存在する ([Wolsquijk and Noble, Development, 105: 386-698(1989)])と考えられているが、新規ニューロンの発生は通常起こらない。しかし、ラットは歯状回や嗅球のような制限された成体脳領域において、新規なニューロンを発生する制限された能力を示す [Kaplan, J. Comp. Neurol., 195: 323(1987); Bayer, S.A. NY, Acad. Sci., 457: 163-172(1985)]がこれは全ての哺乳類に適用できない：および成体霊長類では新規ニューロンの発生はみられない ([Rakic, P., Science, 227: 1054(1985)]。このような殆どの哺乳類（特に霊長類）における新規ニューロン細胞の発生能の欠如は、長期記憶保持にとっては利点であるかもしれない：しかし、傷害または病気により失われたニューロン細胞の置換が必要な場合には、明確な欠点となる。成体哺乳類CNSの障害や病気による細胞の欠失に対する新規細胞の発生能の欠如を伴う哺乳類CNSにおける細胞の低い代謝回転は、成体哺乳類CNSが幹細胞を含まないという仮定に至った。しかし、インビトロにおいて幹細胞の性質を示す細胞がCNSから最近単離された。胚 [Reynolds et al., J. Neurosci., 12: 4565(1992)]から成体 [Reynolds and Weiss, Science, 255: 1707(1992)]にこの細胞は存在し、障害や病気に応答して新規細胞を産生しないが、成体CNSが、造血系と同様に幹細胞およびそのプロゲニの分化および増殖により自己を修復しかつ新規細胞を産生する能力を有することを示している。インビボ実験から得られた最近の知見は、比較的静止した幹細胞細胞が成体脳室の表皮下の裏側に存在することを示している (Moreshead et al., Neuron vol.13(5):1071-1082(1994))。これらの幹細胞は、適当な刺激の下に、神経の損傷または病気の場合

に置換細胞源となりえる。

造血幹細胞の生存、伸張および増殖並びに肝臓、腸および皮膚の幹細胞系は、

多数の異なる栄養因子のコントロール下にあることが示された。例えば、造血系においてエリスロポエチンおよびグリコプロテインCSF(コロニー刺激因子)のような成長因子および様々なインターロイキンが幹細胞機能を調節する因子として単離された [Metcalf, D., *Bioassays*, 14(12): 799-805(1992)]。

胚発達期間におい神経細胞における栄養因子の影響の研究は、血小板由来成長因子(PDGF)、毛様栄養因子(NTF)、塩基性繊維芽成長因子(bFGF)、上皮成長因子(EGF)、形質転換成長因子 $\alpha$ (TGF $\alpha$ )および神経成長因子(NGF)のような内生的発生物質が出産前の神経系の発達に寄与することを示唆している。例えば、0-2A細胞として知られる胚神経プロゲニター細胞の型はオリゴデンドロサイトを与え、かつタイプ2のアストロサイトを与える。PDGFの存在下において、0-2A細胞は分割し、幾つかの分割の後、オリゴデンドロサイトに分化する。NTFおよび基質因子の添加はPDGFの添加よりも、0-2Aプロゲニター細胞をタイプIのアストロサイトに分化を進行させる [Raff et al., *Nature(Lond)*, 303: 390-396(1983)]。bFGFはニューロンに発達する胚プロゲニター細胞の増殖において二倍の増加をもたらす [Gensberger et al., *FEBLett.*, 217: 1-5(1987)]。CattaneoおよびMcKay(1990)は同時にまたは逐次的に成長因子を加えると、因子を個々に加えた時には明らかではなかった、新規な応答を顕在化することを示した。彼らは、bFGFを前もって加えた場合にのみ、NGFが胚ニューロブラストの増殖を刺激してニューロンを産生することを示した [Cattaneo, E. and McKay, R., *Nature*, 347: 762-765(1990)]。bFGFはまた、PDGFに接触した際に、PDGF受容体の発現に影響を与え、0-2Aプロゲニター細胞の分化をブロックすることが示された [McKinnon et al., *Neuron*, 5: 603-614(1990)]。EGFまたはTGF $\alpha$ は培養内において成長する胚網膜神経上皮細胞における細胞分裂促進性効果を示し、成長因子の継続的存在下において、ニューロンを与えるがグリア細胞を与えないプロゲニター細胞となる [Anchan et al., *Neuron*, 6: 923-936(1991)]。同じ研究において、ニューロンおよびミューラー細胞は、出産後のラット神経上皮由来の培養において生じることが

報告されている。

CNS障害としては、神経組織変性障害（例えばアルツハイマーおよびパーキンソン病）のような多数の病気、急性脳障害（例えば卒中、頭部障害、脳性麻痺）

およびCNS機能不全を伴う多数の疾病（例えば鬱病、癲癇、および精神分裂病）が挙げられる。近年、神経組織変性障害は、これらの障害の危険性を有する初老の人口が増大しているため、重要な問題となってきた。アルツハイマー症、複合硬化症、ハンチントン病、筋萎縮性側方硬化症、およびパーキンソン病を含むこれらの障害は、CNSの特定の部位における神経細胞の分解に関連しており、これらの細胞または脳部位が所定の機能をはたすことを不可能にする。神経組織変性障害に加えて、急性脳障害はしばしば神経細胞の喪失、患部脳部位の不適当な機能、およびその後に行動異常を起こす。CNS機能障害の最も一般的なタイプ（患者数に関連して）は、神経細胞の喪失により特徴づけられるのではなく、むしろ存在する神経細胞の異常な機能により特徴づけられる。これは、ニューロンの不適当な発火（firing）、または神経伝達物質の異常な合成、放出および変遷過程によるものであろう。これらの機能障害の幾つかはよく研究されており、鬱病および癲癇のような障害は詳細にわたり研究されているが、神経症および精神病的様な他の障害はあまり理解されていない。

現在までのところ、CNS障害の一次的な治療は薬剤の投与により行われてきた。不幸なことにこの型の治療は、血液-脳関門を通過する薬剤の限られた能力、およびこのような薬剤を長期に渡り投与された患者が得る薬剤耐性を含む多数の複雑な状況を伴う。例えば、パーキンソン病の患者におけるドーパミン様活性の部分的回復はレボドーパ(levodopa)（レボドーパは血液-脳関門を通過することができるドーパミン前駆体である。）により達せられる。しかし、患者はレボドーパの効果に耐性となり、そのためその効果を維持するためには、絶え間なく投与量を増加させることが必要となる。加えて、増加し、コントロールできない動きのようなレボドーパに伴う多数の副作用が現れる。

神経学的疾患の緊急的な治療技術としては、CNS内に細胞を移植し、ホスト神経細胞の機能喪失または機能異常を置換または補償することが挙げられる。胚CNS

S細胞はヒトの試験においては良好な結果が得られており [Winder et al., *New Eng. J. Med.*, 327:1556(1992)]、好ましいドナー組織であるが、倫理的にも政治的にも、また、十分な量の組織の入手性から考えてもこれらの細胞の使用は制限される。CNS障害の治療における使用のためのドナー組織の他の型は研究され

ている。これらの例としては、遺伝工学的に改良された神経細胞 [Renfranz et al., *Cell*, 66: 173(1991); Synder et al., *Cell* 68: 1, (1992)]、フィブロブラスト [Kawaja et al., *J. Neurosci.*, 12: 2849, (1992)]、筋細胞 [Jiao et al., *Nature*, 363: 456(1993)]、グリアプロゲニター細胞 [Groves et al., *Nature*, 362: 453(1993)]、カプセル化細胞 [Hoffman et al., *Exp. Neurol.*, 132: 100(1993)]が挙げられる。

移植方法は最近行われている神経学的疾患の治療において明らかな改良をもたらしたが、この技術はまだ完全なものではない。例えば、移植において幾つかの細胞型はホストCNS組織と融和しない。特に、非神経一次細胞培養の使用は、移植された物質のホスト組織に結合する能力を制限する。一次神経組織から得られる不滅化したドナー細胞は結合することができるが、これらの細胞内に取り込まれた癌細胞の遺伝学的発現はコントロールするのが困難であり、癌および他の合併症を引き起こす。ドナーおよびホストの移植細胞の拒絶という結果もありうる。また、移植細胞が癌を形成したり、またはドナー組織からホストへ感染性物質が渡るといふ可能性もある。

Gage et alは、米国5,082,620号において、適当なCNS部位内に遺伝的に改良した神経細胞を移植することにより、欠損、疾病またはCNS細胞障害を治療する方法を報告している。上記特許に記載されたドナー細胞は非神経一次培養から得られたものであるが、遺伝的に形質転換された神経細胞系も使用できることが示唆された。これらのドナー細胞源は本質的に問題がある。Gageらは、彼らの技術において使用するドナー細胞により課せられる制限を認識し、および“少数の非形質転換細胞培養系の複製”ということ認識している。彼らはまた、“非複製神経細胞がウイルス感染に対して難治性であること”も認識している。この後者の記述は従来技術における方法を遺伝的に改良した神経細胞（これらは胚組織から



得られない限り正常な有糸分裂促進物質ではない)に適用する試みに伴う困難性を要約したものである。この技術における本質は組織拒絶の可能性である。理想的には、遺伝的に改良された移植細胞は自己由来のものであるべきであり、それにより免疫学的複合作用を防ぐ-i.e.もし、インビトロにおいて、患者自身の静止性の神経幹細胞を遺伝工学的に改良および/または刺激を行って、新規な神

経細胞に分化するように分裂させ、欠失または障害を受けた神経組織を置換するように移植することができるならば、有利であろう。

生存中に哺乳類の脳内に存在することが知られている多能性神経幹細胞[Reynolds and Weiss, Science, 255: 1707(1992)]は、上皮成長因子のような成長因子の存在下において、刺激を行って、有糸分裂的に活性にすることができる非形質転換神経細胞源を提供する。培養内で、神経幹細胞を増殖するように誘導し、大量の未分化の神経細胞を与えることができ、これらの未分化の神経細胞を神経細胞の主型に分化して移植すること、遺伝的に改良して移植すること、または薬剤のスクリーニングやその他の目的に使用することが可能である。

神経幹細胞および/またはそのプロゲニーの有糸分裂活性を上昇、低下または他の方法で変化させるために、インビトロにおいて神経幹細胞の増殖を調節することができるのは利点である。移植、遺伝的改良、薬剤スクリーニングなどのために得られるプロゲニーの数がより増加するため、静止神経幹細胞の有糸分裂活性の上昇は明らかに有利である。また、増殖誘導性成長因子の存在下において成長する増殖神経幹細胞が、インビトロにおいて、どのように増殖量の低下を調節することができるか決定することは利点である。この情報はインビボにおいて、米国継続特許番号08/149,508号(1993年11月9日)に記載されているような増殖誘導成長因子を調節するのに使用することができる。成長因子または成長因子の組み合わせ存在下において、有糸分裂的に活性になる神経幹細胞の数だけでなく、これらの幹細胞の前駆プロゲニーの有糸分裂の速度も調節しえることは、また有利である。

脳または脊髄組織の障害に対する応答においてグリオシス(gliosis)が生じる。このプロセスから生じるグリア瘢痕は、神経軸索が障害を受けた部への結合

の再確立を防ぎ、機能の破壊を防ぐ。障害を受けた部位および障害を受けた部位に非常に近接した部位から少し離れた部位の両方の部位において増殖するアストロサイトは、グリア瘢痕の重要な細胞成分である(Reier, P.J., *Astrocytes* vol. 3: 263-323(1986))。神経幹細胞およびそのプロゲニーの障害に応答した増殖はグリオシスの発達における因子であるかもしれない。障害を受けた部位のグリオシスの範囲を縮小することができれば、神経修復を増強することができる。

障害部位に近接した部位でアストロサイトの数を増加するように誘導する有糸分裂活性を阻害または減少させることによりグリオシスを低下させることができるのは利点である。神経幹細胞および/またはそのプロゲニーの障害-誘導シグナルに応答して増殖する能力を低下させることが、グリア瘢痕形成範囲を制限する方法であってもよい。分裂した軸索の、増加した障害部位に対する再結合する能力は、神経修復プロセスおよび修復機能の質を改良する。

前述した、移植または他の使用のためのCNS細胞源の不足という観点から、未制限の増殖を誘導するために腫瘍形成遺伝子を挿入することにより意図的に不死化するという方法によらない、ヒトおよび非ヒトから得られる胚および成体神経細胞を大量に培養する確実な方法(それにより細胞の正常な機能への遺伝的変化という影響に対するいかなる問題も除かれる)に対する希求が存在する。また、特定の条件下において、インビトロおよびインビボにおける細胞増殖を調節することができる必要がある。

従って、本発明の目的は、成長因子または成長因子の組み合わせの様な特定の生物学的因子の添加を通じて、幹細胞が生育する培地を改変することにより、CNS幹細胞の増殖をインビトロにおいて調節する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、CNS幹細胞の増殖をインビボにおいて調節する方法およびそのための治療組成物を与えることである。組成物は、成長因子およびその組み合わせのような特定の生物学的因子を含んでおり、これらの成長因子はCNSの脳室系内に注入され幹細胞増殖を調節する。

本発明のこれらおよび他の目的は以下に述べる詳細な説明および特許請求の範囲の記載から当業者に明らかである。

上述した参考文献はいずれも本発明を記載するものではなく、先行技術ではない。これらの参考文献は背景情報開示の目的で示されたものである。

#### 本発明の要約

多能性神経幹細胞および／またはそのプロゲニーのインビトロにおける増殖を調節する方法を以下に述べる。

方法は、ニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトに分化し得

るプロゲニーを生産することができる多能性神経幹細胞を少なくとも一種含む哺乳類神経組織を分断する工程、および少なくとも一種の幹細胞増殖を誘導する増殖因子および多能性神経幹細胞および／またはそのプロゲニーの増殖を調節する調節因子を含む培地内で、多能性幹細胞を増殖する工程を含む。

さらに、多能性神経幹細胞および／またはそのプロゲニーのインビボにおける増殖を調節する方法および組成物を以下に述べる。該方法は、哺乳類の脳室内に、多能性神経幹細胞の増殖および／またはそのプロゲニーの増殖における調節効果を有する因子を少なくとも一種含む治療組成物を到達させる。

本発明の一つの実施態様において、増殖因子はbFGFであり、および調節因子はEGFまたはヘパラン硫酸であり、これらは幹細胞プロゲニーの増殖速度を増加する。

本発明の他の態様において、神経幹細胞の増殖を阻害する因子またはその組み合わせは、インビボにおいて細胞増殖を低下させるように投与される。

#### 図面の簡単な説明

図1： 多能性神経幹細胞の増殖を示した概略図。(A) 増殖因子の存在下において幹細胞は分裂し、より多くの幹細胞およびプロゲニター細胞からなる未分化細胞の球体(sphere)を与える。(B) クローン的に誘導された未分化細胞の球体が分断されて単細胞として非接着物質上に置かれ、増殖因子存在下に置かれると、各幹細胞は新しい球体を産生する。(C) もし球体が分化を許容するような条件下において培養される場合には、プロゲニター細胞はニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトに分化する。

図2： (A) 20 ng/mlのEGF中で培養した10日後の神経球体(neurosphere)

の写真（倍率：100倍）。（B）20 ng/mlのFGF中で培養した10日後の神経球体の写真（倍率：100倍）。（C）20 ng/ml EGF+20 ng/ml FGF中で培養した10日後の神経球体の写真（倍率：100倍）。

図3： 20 ng/ml EGF+20 ng/ml FGFまたは20 ng/ml FGF+2  $\mu$ g/mlヘパラン硫酸の存在下において、成体マウス脊髄の頸部、胸部および腰部から誘導された一次細胞由来の神経球体の数を示している。

#### 発明の詳細な説明

本発明は多能性神経幹細胞の増殖を調節および操作する方法および組成物の研究に基づいており、インビトロおよびインビボにおける多能性神経幹細胞由来のプロゲニーの数を調節することに関する。“神経幹細胞”または“中枢神経系(CNS)幹細胞”という用語は、比較的静止した、神経組織由来の未分化の幹細胞を意味し、増殖することができ、より多くの神経幹細胞（従って、自己保存を確立する）およびプロゲニター細胞のもととなることができるものを意味する。“多能性”という用語はニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトのような分化神経細胞の主要な型の元となるプロゲニーを産生することが可能な神経幹細胞を意味する。比較して、分化細胞の二種類の型のもととなる未分化細胞（例えば、オリゴデンドロサイトおよびアストロサイトの元となるO-2A細胞）は“二分化性(bipotent)”と呼び、一種類の型の分化細胞のみを生ずるものを“単能性(unipotent)”と呼称する。

“プロゲニター細胞”という用語はまた、神経幹細胞由来の未分化細胞を意味するが、制限された増殖能を有し、自己保存を行わない幹細胞とは区別される。各神経プロゲニター細胞のプロゲニーは、適する条件下においてニューロン、アストロサイト（I型またはII型）またはオリゴデンドロサイトに分化する。オリゴデンドロサイトは、中枢神経系(CNS)における軸索に接するミエリン由来の分化したグリア細胞である。オリゴデンドロサイトはガラクトセレブロシド(+)表現型、ミエリン塩基性タンパク(+)表現型、およびグリア繊維性酸性タンパク(+)表現型[GalC(+),MBP(+),GFAP(-)]を有する。ニューロンはニューロン特異性エノラーゼ(+)表現型、ニューロフィラメント(+)表現型、微小管を伴うタンパクま

たはTau-1(+)表現型[NSE(+),NF(+),MAP-2(+)]またはTau-1(-)]を有する分化した神経細胞である。アストロサイトはGFAP(+),GalC(-)、およびMBP(-)表現型を有する分化したグリア細胞である。

CNS幹細胞については既に報告されており、その使用が記載されている[Reynolds and Weiss, *Science*, 255: 1707(1992); Reynolds et al., *J.Neurosci.*, 12: 4565(1992); Reynolds and Weiss, *Restorative Neurology and Neuroscience*, 4: 208(1992); Reynolds and Weiss, "Neuronal Cell Death and

Repair" ed. Cuello, A.C., Elsevier Science, pp. 247-255(1993)]。さらに、これらの細胞の有用性は、PCT出願公開番号WO 93/01275号、WO 94/16718号、WO 94/10292号およびWO 94/09119号に記載されている。他の哺乳類組織内で見いだされた幹細胞のように、CNS幹細胞は自己保存を行うことができ、かつ新規幹細胞およびニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトに分化することができるプロゲニター細胞を含む大量のプロゲニーを産生することができる。

CNS幹細胞は、ReynoldsおよびWeiss[*Science*, 255: 1707, (1992)]らによる方法、上記に述べたPCT出願特許および下記の実施例1に記載されている方法により単離および培養することができる。多能性CNS幹細胞は脊髄の髄体(conus medullaris)、頸部、胸部および腰部、脳幹、線条体および視床下部を含む様々なCNS領域内で発生することができる。神経幹細胞はこれらの各領域由来の組織から得ることができ、インビトロにおいて分裂するように誘導し、自己保存を行い、ニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトを含む大量のプロゲニーを産生することができる。

要約すると、多能性神経幹細胞は神経組織から得ることができ、並びに好ましくは血清を含まず、かつ細胞の生存を支持することが知られている物質の組み合わせを含んでいてもよい培地内で生育する。適する血清を含まない培地は、この明細書において、以下、“完全培地”と呼称し、ダルバコ改変イーグルス培地(DMEM)およびF-12栄養混合物(ギブコ)(1:1)、グルコース(0.6%)、グルタミン(2 mM)、炭酸水素ナトリウム(3mM)、HEPES(4-[2-ヒドロキシエチル]-1-ピペラジンエタンスルホン酸)バッファー(5mM)並びにインスリン(25 $\mu$ g/ml)

)、トランスフェリン( $100 \mu\text{g/ml}$ )、プロゲステロン( $20 \mu\text{M}$ )、ブトレスシン( $60 \mu\text{M}$ )、およびセレンウムクロリド( $30 \text{ nM}$ )を含む、血清の代わりに用いられる所定のホルモン混合物および塩混合物(10%; シグマ社製)を含んでいてもよい。多能製幹細胞の増殖を誘導する、少なくとも一種の生物学的因子を完全培地に添加する。

“生物学的因子”という用語はこの明細書において、タンパク、ペプチド、核酸、成長因子、ステロイドまたは幹細胞または幹細胞プロゲニーに対する成長、

増殖、分化、栄養または調節効果(単一でも他の生物学的因子との組み合わせによっても)を有する他の天然または人工の分子のような、CNS細胞内において機能する生物学的に活性な物質を意味する。生物学的因子の例としては、酸性および塩基性繊維芽細胞成長因子(aFGF, bFGF)、上皮成長因子(EGF)およびEGF様リガンド、トランスフォーミング成長因子アルファ( $\text{TGF}_\alpha$ )、インスリン様成長因子(IGF-1)、神経成長因子(NGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、トランスフォーミング成長因子ベータ( $\text{TGF}_\beta$ )、脳由来神経栄養因子(BDNF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、およびグリア由来神経栄養因子(GDNF)を例とする栄養因子; ホルモン12-ミリステート13-アセテート、スクワロsporin、CGP-41251、チルホスチン(tyrophostin)などのような成長因子活性を有する細胞内経路の調節剤; アクチビンおよび甲状腺刺激ホルモン(TRH)を例とするホルモン; インターロイキン、Bcl-2遺伝子生産物、骨形成タンパク(BMP-2)、マクロファージ炎症性タンパク(MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2)を例とする様々なタンパクおよびポリペプチド; 例えばEGF受容体、FGF受容体などの転写に対する反意鎖のようなオリゴヌクレオチド; ヘパラン硫酸のようなヘパリン様分子; およびアンフィレグリン、レチノイン酸および腫瘍壊死因子 $\alpha$  ( $\text{TNF}_\alpha$ )を含む、神経幹細胞または幹細胞プロゲニーに対する効果を有する様々な他の分子が挙げられる。

個々に多能性神経幹細胞に対する増殖効果を有するEGFおよびbFGFのような生物学的因子を、この明細書では、“増殖因子”と呼称する。一般に増殖因子は細胞表面受容体に結合し、増殖を誘導する。好ましい増殖因子としては、EGF、アンフィレグリン、aFGF、bFGF、 $\text{TGF}_\alpha$  およびこれらの組み合わせ並びにヘパ

ン硫酸のような他の生物学的因子が挙げられる。神経幹細胞の増殖を誘導する特に好ましい組み合わせとしては、EGFおよびbFGFの組み合わせが挙げられる。増殖因子は、通常、培地に対して約10 pg/ml~500 ng/ml、好ましくは約1 ng/ml~100 ng/mlの範囲内の濃度で添加される。EGF、aFGFおよびbFGFの最も好ましい濃度は、それぞれ約20 ng/mlである。

幹細胞はどのような培養容器内で培養してもよく、例えば96ウェルプレートまたは培養フラスコが挙げられる。増殖誘導成長因子または因子の組み合わせ存在下において、多能性神経幹細胞は分裂し、3~4日以内に未分化の幹細胞プロゲ

ニーを生ずる。ここでは“前駆細胞”を意味する、幹細胞プロゲニーは新しく産生された多能性幹細胞およびプロゲニター細胞を含む。インビトロにおいて、単一幹細胞のプロゲニーは、この明細言において“神経球体(neurosphere)”と称する前駆細胞の集合体を典型的には形成するが、培養条件を（例えば、増殖細胞が接着する処理基質を与えることにより）増殖細胞が特有の神経球体を形成しないように、変えてもよい。前駆細胞はいずれの神経細胞またはグリア細胞マーカーに対しても免疫応答性ではないが、未分化ONS細胞内で見いだされた中間フィラメントタンパクであるネスチンに対して免疫応答性である [Lehndahl et al., Cell, 60: 585-595(1990)]。

増殖誘導成長因子の継続的存在下において、神経球体内の前駆細胞は継続して分裂し、未分化細胞数の増加の結果神経球体のサイズは増大する [nestin(+), NF(-), NSE(-), GFAP(-), MBP(-)]。分化を促進せずにさらなる増殖を行わせる同じ成長因子または異なる成長因子の存在下において、前駆細胞の継代を行うことができる。細胞を増殖培養法を用いて30回またはそれ以上継代し、前駆細胞の数を指数的に増加させることができる。

上述したインビトロにおけるONS幹細胞の増殖のための培養技術は、EGFまたは他の増殖因子に応答して幹細胞から得られる前駆細胞の数および性質を増加、減少または他の方法で改変する付加的な生物学的因子またはその組み合わせの使用により改良することが可能である。増殖における変化は、形成される神経球体数の増加または減少および/または神経球体のサイズの増大または減少により観察

される（これらは神経球体当たりの前駆細胞数で決定される増殖速度の反映である）。このように、“調節因子”という用語は、この明細書では、幹細胞および／または前駆細胞の増殖に対して調節効果を有する生物学的因子を意味する。例えば、増殖誘導成長因子（例えばEGFのような）に応答してインビトロにおいて増殖する幹細胞数を増加または減少させるならば、そのような生物学的因子は“調節因子”であると考えられる。または、増殖誘導因子に応答して幹細胞数が同数のままであってもよいが、調節因子の添加は幹細胞および／または幹細胞プロゲニーの増殖する速度に影響する。増殖因子は、他の増殖因子と組み合わせて使用される場合には、調節因子の役割をしてもよい。例えば、bFGFおよびEGFの

組み合わせ存在下において形成する神経球体はbFGFのみの存在下に形成される神経球体より明らかに大きく、幹細胞および幹細胞プロゲニーの増殖速度がより早いことを示している。

調節因子の他の例としては、ヘパラン硫酸、トランスフォーミング成長因子ベータ(TGF $\beta$ )、アクチビン、骨形成タンパク(BMP-2)、毛様体神経栄養因子(NTF)、レチノイン酸、腫瘍壊死因子アルファ(TNF $\alpha$ )、マクロファージ炎症性タンパク(MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  および MIP-G)、神経成長因子(NGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、インターロイキンおよびBcl-2遺伝子生産物が挙げられる。増殖因子の転写物に結合するアンチセンス分子およびその受容体に対する転写物はまた、幹細胞増殖を調節する。幹細胞増殖に対する調節効果を有する他の因子としては、c-fos経路を上方制御するホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA; シグマ)を含むc-fos経路(EGFにより活性化されることが知られている中間初期遺伝子)の活性化を阻害するもの、c-fos発現を下方生後するスタウロスポリン（リサーチバイオケミカルインターナショナル）およびCGP-41251（チバーガイギー）並びに受容体へのEGFの結合によるチロシンキナーゼ活性化を抑制するのチルホスチン[Fallon, D et al., Mol. Cell Biol., 11(5): 2697-2703(1991)]などが挙げられる。

神経幹細胞プロゲニーがFGFに応答して増殖する速度を増加するための調節因子としてはヘパラン硫酸およびEGFが好ましい。増殖因子に応答して幹細胞数を



減少させる調節因子としては、 $TGF\beta$  族、インターロイキン、MIP、PDGF、BMP-2、 $TNF\alpha$ 、レチノイン酸( $10^{-6}M$ )およびCNTFが好ましい。増殖因子により産生される神経球体のサイズを減少する因子としては、 $TGF\beta$  族、レチノイン酸( $10^{-6}M$ )およびCNTFが好ましい。

調節因子は、培地に対して約10 pg/ml~500 ng/ml、好ましくは約1 ng/ml~100 ng/mlの範囲内の濃度で添加される。最も好ましい調節因子濃度は、約10 ng/mlである。調節因子レチノイン酸は、1 mMストック溶液から調整され、最終濃度が約0.01  $\mu M$ ~100  $\mu M$ 、好ましくは約0.05~5  $\mu M$ の間となる濃度で使用する。神経球体の発生におけるEGFまたはbFGFの増殖効果を減少させるには、約1  $\mu M$ のレチノイン酸濃度が好ましい。アンチセンス鎖は約1~25  $\mu M$ の濃度で

使用することが可能である。好ましい範囲は約2~約7  $\mu M$ である。増殖を増加するために使用されるFNAおよび関連分子を約1  $\mu g/ml$ ~500  $\mu g/ml$ 、好ましくは10  $\mu g/ml$ ~200  $\mu g/ml$ の濃度で使用してもよい。グリコサミノグリカン、ヘパラン硫酸は様々な細胞性プロセスに影響することが知られる哺乳類細胞表面上に偏在する成分であり、FGFおよびアンフィレグリンのような成長因子分子に結合し、それにより細胞表面の受容体に対するこれらの分子の結合を促進する。これは、約1 ng/ml~1  $\mu g/ml$ 、好ましくは約0.2  $\mu g/ml$ ~20  $\mu g/ml$ 、最も好ましくは約2  $\mu g/ml$ の濃度において、他の生物学的因子と組み合わせて培地に添加することが可能である。

PCT出願特許WO 93/01275、WO 94/16718、WO 94/10292およびWO 94/09119に記載されているように、前駆細胞は様々な神経学的疾患を治療するための移植に使用することができる。移植に使用される細胞は、当業者らに既知の方法を用いて、培地から収集し、異常な神経性または神経変性症状（化学的、電気的、機械的または他の傷害、実験的な神経領域の吸引または病気若しくは加齢プロセスの結果得られるものを含む全ての症状）を呈する動物に移植することができる。

ここに記載された方法は、インビボにおいて患者の正常な静止幹細胞の増殖の調節のために生物学的因子を使用する前に、インビトロにおける多能性哺乳類神経幹細胞の増殖におけるその生物学的因子の増殖または調節効果を試験するため

に使用することができる。機能傷害を有する組織、病変を有する組織または傷害を受けた組織への生物学的因子の増殖または調節効果を試験するために、神経幹細胞を、神経性疾患を有するヒトから得てもよい。調節因子を含む治療組成物を、様々な神経性障害、疾患または傷害の治療に使用するために調製することが可能である。該組成物は一種以上の調節因子を、生理学的に許容される形態で上記の濃度で含む。

治療組成物は神経幹細胞の増殖を調節するためにインビボにおいて投与されてもよい。正常な静止神経幹細胞は、脳室領域に近接したCNS内に位置する。側脳（第一および第二）室は前脳内である。第三の脳室は後脳内に位置する第四の脳室に接続する前脳の低位置の腔である。前記脳室構造と連続する中心管は、脊髄の脳室成分である。

CNS幹細胞が、脳室に亘打ちされた組織内に位置するという事実は、これらの細胞のインビボにおける改変および操作、およびCNSの異なる領域に影響する様々な神経性疾患、障害および障害の根本的な治療において幾つかの有利な点を与える。これらの治療は、ここに述べる方法により、患部領域に近い脳室を取り巻く幹細胞がインビボにおいて操作または改変されるように、改良されることができる。脳室系はほとんど全ての脳領域内で見いだされ、従って、患部領域へのより早い接近を可能とする。もし、幹細胞を、成長因子またはウイルスベクターを含む組成物と接触させることにより改変したければ、その組成物を脳室に投与する装置を移植することが比較的簡単である。例えば、浸透圧ポンプに接続したカニューレを使用して、組成物を分布させてもよい。または、組成物を脳室内に直接注入してもよい。これは、傷害または疾病により障害を受けた領域内にCNS幹細胞プロゲニーの移入を許容する。さらに、脳室が多くの脳領域に対して極めて近傍にあるため、幹細胞またはそのプロゲニーから分泌された神経性薬剤の分布を許容する。

グリア瘢痕組織の形成の結果生ずるグリオーシスはCNS組織への傷害の結果起こる。瘢痕組織は、軸索の成長および重要な要素の再接続における主要な阻害活性を有し、それにより脳または脊椎傷害の後の機能回復を阻害すると考えられる

。CNS癥痕組織の唯一の成分ではないが、アストロサイトは関連する主要な成分の一つである(Reier, P.J. *Astrocytes* vol. 3: 263-323(1986))。グリオシス(少なくとも一部)は、以前の静止幹細胞の増殖から生じる可能性がある。CNSに対する傷害後、神経幹細胞増殖を阻害することが知られている因子を脳室系に投与することは有利である。アストロサイトを生ずる幹細胞プロゲニーの増殖を低減することにより、傷害部位における癥痕組織の形成を減少させ、軸索成分の再結合を許容する条件を増強する。好ましい阻害因子はBMP-2である。

#### 実施例1

胚性脳組織由来の多能性CNS幹細胞のインビトロ増殖-EGF応答神経球体増殖

胚齢14日(E14)のCD<sub>1</sub>アルビノマウス(チャールズリバー)を断頭し、脳及び線条体(striata)を無菌方法を用いて除去した。組織を、口焼きしたパスツール

ピペットを用いて、完全培地内に機械的に分離した。細胞を800r.p.mで5分間遠心分離を行い、上澄み液を吸引し、細胞を計測するために、再び完全培地内に再懸濁した。

細胞を20ng/mlのEGFを含む完全培地内に、25,000細胞/mlの密度で懸濁した。5mlチップがついたエッペンドルフリビートピペッターを使用して、200 $\mu$ lの細胞懸濁液を前処理を行った基質を含まない96ウェルプレート内の各ウェルに添加し、37℃、湿度100%、95%空気/5%CO<sub>2</sub>の条件下のインキュベーター内においた。

細胞が、インビトロにおいて最初の48時間以内及び3~4日(DIV)後迄に増殖した時、それらは神経球体として知られる小さなクラスターを形成しており、これは4~6DIVの間に基質を持ち上げた。1ウェルあたりの産生した神経球体数を計測し、細胞を継代した後(実施例2)、EGFに応答して産生される神経球体数を、他の生物学的因子のみ、またはEGFとの組み合わせ(実施例3)に応答したものと比較し、結果を表に示した。

#### 実施例2

増殖神経球体の継代

パラダイム1:細胞および培地は実施例1に述べたように調製した。細胞を、

前処理した物質を含まないフラスコ（コーニング）内に $0.2 \times 10^6$ 細胞/mlプレートし、実施例1に述べたように培養を行った。

7DIV後、神経球体を除去し、400r.p.m. で遠心分離を2.5分を行った。ペレットを機械的に、口焼きしたガラス製のパスツールピペットを用いて、2 mlの完全培地にそれぞれ細胞を分離した。

20 mlのEGF含有完全培地を含む75cm<sup>2</sup>組織培養フラスコ内に $1 \times 10^6$ 細胞を再プレートした。幹細胞の増殖および新規神経球体の形成を再度開始した。この工程を6～8日毎に繰り返すことができる。

パラダイム2：EGFの代わりに20 ng/mlのFGFを完全培地に添加する工程以外は、実施例1および実施例2のパラダイム1の方法を繰り返した。

パラダイム3：20ng/mlのEGFに加えて、20 ng/mlのFGFを完全培地に添加する工程以外は、実施例1および実施例2のパラダイム1を繰り返した。

継代により得られた神経球体は、実施例1に述べられているように、機械的に分離し、細胞を96ウェルプレート（ヌンクロン）上に再プレートすることができる。特定の生物学的因子、または生物学的因子の特定の組み合わせの、継代した神経球体由来の細胞からの神経球体の増殖における効果を測定し、一次組織由来の細胞から得られた結果と比較することができる。

### 実施例3

様々な増殖因子および調節因子の組み合わせに応答した線条体由来神経球体増殖のアッセイ

パラダイム1：実施例1に述べた方法により調製した一次線条体細胞を、実施例1の記載に従い、成長因子を含まない完全培地に懸濁し、96ウェルプレート（ヌンクロン）内にプレートし、培養を行った。1時間培養を行った後、完全培地内に、特定の増殖因子またはEGF若しくはbFGF（組み換え型ヒトbFGF；R & D システム）を含む増殖因子の組み合わせ、またはEGFとbFGFの組み合わせ、またはEGF、FGFとヘパラン硫酸（シグマ）またはbFGFとヘパラン硫酸を、各成長因子が20ng/ml、ヘパラン硫酸が2  $\mu$ g/mlの濃度で、プレートの各ウェルに添加した。

アクチビン、BMP-2、TGF- $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2（

全てChiron Corp.から得られた)、TNF $\alpha$ 、NGF(シグマ)、PDGF(R & Dシステム)、EGFおよびCNTF(R.Dunn and P.Richardson, McGill大学)を別々の完全培地を含むフラスコ内に、最終濃度が0.2  $\mu$ g/mlとなるように調製した。レチノイン酸(シグマ)を $10^{-6}$ M濃度で添加した。 $10 \mu$ lのこれらの調節因子含有溶液の一つを96ウェルプレートの各増殖因子含有ウェルに添加した。増殖因子のみを含有するコントロールウェルもまた調製した。

他の一連の実験において、これらの各調節因子の性質を誘導する神経球体を、

これらの存在下に、増殖因子を含まない完全培地中で細胞を生育することにより試験を行った。EGFまたはFGFのような増殖誘導因子の不存在下で使用した場合には、EGFを除いて神経幹細胞の増殖に効果を示したものはなかった。

アクチビン、BMP-2、TGF- $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、TNF $\alpha$ およびEGFの添加を二日毎に繰り返し、CNTFは毎日添加し、およびレチノイン酸、NGFおよびPDGFは実験の始めに一回添加したのみであった。細胞を10-12日間培養を行った。各ウェル内の神経球体数を計測し、得られた計測数をクリケットグラフIIIを用いて表にした。他の、球体のサイズおよび形状に関する情報についても記述した。

一般に、bFGFの1ウェル当たりの産生神経球体数における増殖効果は、EGFよりも大きかった。20 ng/mlのEGF存在下において、1ウェルあたり約29神経球体が産生された。bFGFの存在下において、約70神経球体が産生された。しかし、bFGFのみでは(図1B)神経球体のサイズは、EGFの存在下において産生されるものの約20%であった(図1A)。EGFおよびbFGFの組み合わせ(図1C)は、EGF単独の場合よりも、明らかにより多くの神経球体を産生したが、bFGF単独の場合よりも少なかった。また、神経球体のサイズはbFGFにおいて観察されるよりも大きく、EGFにおける場合とほぼ同様の大きさであった。bFGF産生球体の場合には、ヘパラン硫酸の添加により、EGFに反応して生ずるサイズの約70%に、そのサイズが増大した。これらのデータはEGFおよびFGFが幹細胞の有糸分裂の誘導に関して異なる作用を有することを示している。

増殖因子含有ウェルに添加した調節因子の効果を表1に要約した。一般に、TG

F- $\beta$ 族、インターロイキン、マクロファージ阻害タンパク、PDGF、TNF $\alpha$ 、レチノイン酸( $10^{-6}$ M)およびCNTFは、全ての試験を行った増殖因子およびその組み合わせにおいて神経球対数を顕著に減少させた。BMP-2(10 ng/mlの投与量)は、完全にEGFに応答した神経球体の増殖を無効にした。EGFおよびヘパラン硫酸は両方とも、bFGFに応答して形成される神経球体のサイズを増大した(約400%)。パラダイム2: アンチセンス/センス実験: 胚組織を実施例1に記載されたように調製し、96ウェルプレート内の完全培地中にプレートした。アンチセンスおよびセンス実験を、次のオリゴデオキシヌクレオチドを使用して行った(全ての配

列は5' から3' へと記載されている。):

EGF 受容体: センス鎖: GAGATGCGACCCCTCAGGGAC  
 アンチセンス鎖: GTCCTGACGGTCGCATCTC  
 EGF: センス鎖: TAAATAAAAGATGCCCTGG  
 アンチセンス鎖: CCACGGCATCTTTTATTTA

各オリゴデオキシヌクレオチドを生育し、 $\text{dH}_2\text{O}$ で希釈を行って、 $-20^\circ\text{C}$ に維持した。96ウェル内の各ウェルに $10^{-6}$ Mのオリゴデオキシヌクレオチドを加え、最終濃度がそれぞれ、1、2、3、4、5、10、または $25^{-6}$ Mとなるように調製した。オリゴデオキシヌクレオチドを24時間毎に加えた。EGF受容体(EGFr)およびEGFオリゴデオキシヌクレオチドをbFGF(20 ng/ml)内で生育した培養に適用し、EGFrオリゴデオキシヌクレオチドをEGF(20 ng/ml)内で生育した培養に適用した。細胞をインキュベーター内で、 $37^\circ\text{C}$ 、湿度100%、5%  $\text{CO}_2$ という条件下で培養した。10~12日後に、1ウェルあたりの神経球対数を計測し、表にした。 $3^{-6}$ Mの濃度のアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドは、EGFおよびFGFに反応して、1ウェルあたりの産生される神経球体数の50%減少を生じたが、センスオリゴデオキシヌクレオチドは産生される神経球体数に影響を与えなかった。センスおよびアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドは、 $10^{-6}$ Mより高い濃度を使用すると細胞に対して毒性であった。

同様の実験を以下のオリゴヌクレオチドを使用して行った。

FGF 受容体: センス鎖: GAACTGGGATGTGGGGCTCG

アンチセンス鎖： CCAGCCCCACATCCCAGTTC

FGF : センス鎖： GCCAGCGGCATCACCTCG

アンチセンス鎖： CGACGTGATGCCGCTGCC

FGF受容体(FGFr)およびFGFオリゴデオキシヌクレオチドを、EGF中で生育した培地に加え、FGFrオリゴデオキシヌクレオチドを、bFGF中で生育した培地に加えた。

パラダイム3 : 胚組織を実施例1に記載された方法に従い調製した。20 ng/mlのEGFまたはbFGFを含む完全培地を各ウェルに加えた。10 $\mu$ lの希釈したホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)を、実験の始めに96ウェルプレート内

の各ウェルに500 $\mu$ lチップのエッペンドルフリビートピペッターを用いて一度に加え、最終濃度がそれぞれ、10、20、40、100、または200 $\mu$ g/mlとなるように調製した。細胞をインキュベーター内で、37℃、湿度100%、5%CO<sub>2</sub>という条件下で培養した。10~12日後に、1ウェルあたりの神経球対数を計測し、表にした。

パラダイム4 : 胚組織を実施例1に記載された方法に従い調製した。10 $\mu$ lの希釈したスタウロスポリンを、96ウェルプレート内の各ウェルに500 $\mu$ lチップのエッペンドルフリビートピペッターを用いて加え、最終濃度がそれぞれ、10、1、0.1または0.001 $\mu$ Mとなるように調製した。細胞をインキュベーター内で、37℃、湿度100%、5%CO<sub>2</sub>という条件下で培養した。10~12日後に、1ウェルあたりの神経球対数を計測し、表にした。

#### 実施例4

成体脊髄幹細胞増殖—特定の生物学的因子またはその組み合わせに対するインビトロ応答

6週間~6カ月のマウスから脊髄組織を以下のように除去した。

頭部組織を椎柱領域頭側~第一肋骨から除去し；胸髄組織を尾側~第一肋骨および約5mm頭側~第一肋骨から得て；脊髄の残部を構成する腰仙部組織を得た。切断した組織を通常の人工脳脊髄液(aCSF)中で洗浄し、小断片にカットして、高Mg<sup>2+</sup>および低Ca<sup>2+</sup>並びにトリプシン/ヒアルロンダーゼおよびキヌレン酸酵

素を含む酸素添加されたaCSFを含む攪拌フラスコ内にプレートした。組織を酸化、攪拌および30℃で1 1/2時間加熱し、次にバイアルビンに移して、培養液(DME M/12/ホルモン混合物)内でトリプシン阻害剤により処理を行った。組織を、口焼した細いピペットで、25~50倍に倍散した。分離した細胞を400r.p.m. で遠心分離を5分を行い、新鮮な培養液に再懸濁した。細胞を35mm皿(コースター)上にプレートし、安定させた。ほとんどの培養液を吸引し、新鮮な培養液を添加した。EGF単独またはEGFおよびbFGFを、幾つかの皿に最終濃度が20 ng/mlとなるように加え、bFGF (20 ng/ml) を、2  $\mu$ g/mlのヘパラン硫酸と共に残りの皿に添加した。細胞を、37℃、湿度100%、5 % CO<sub>2</sub>という条件下で10~14日間培養した。

1ウェル当たりの産生された神経球体数を測定し、結果を表にした。EGF単独使用は、どの脊髄領域からも神経球体の発生がみられなかった。EGFとbFGFの存在下において、神経球体は脊髄の全ての領域、特に腰部仙椎領域から発生した。EGF + FGFおよびFGF + ヘパラン硫酸の組み合わせは頸部において同数の球体を産生したが、bFGFとヘパラン硫酸の組み合わせは、胸部および腰部領域からより少ない神経球体を産生した(図3)。

#### 実施例5

インビトロにおける増殖因子に応答した霊長類組織からの神経球体の発生

第一世代神経球体を成体ヒト組織から得た。ルーチンの生検において、65歳の女性の患者から正常組織を得た。生検部位は右前頭葉であり、側脳室の前角/後角のチップから6mmであった。組織を実施例4に記載の方法と実質的に同じ方法によりaCSFを用いて調製した。幹細胞をT25フラスコ(ヌンクロン)内の、20ng/mlのEGF、20ng/mlのbFGF、または各20ng/mlのEGF + bFGFを含む完全培地中で培養した。フラスコを2~3日毎に神経球体の形成が行われているか評価した。EGFまたはFGF単独それぞれよりも、EGF + EGFの組み合わせの方がより多くの神経球体を産生した。

#### 実施例6

傷害CNSにおける幹細胞および幹細胞プロゲニー増殖の阻害

A: 脊髄傷害



成体雄CD1マウス(チャールズリバー、St. コンスタント、ケベック)を、ペントバルビタールナトリウム塩(80 mg/kg、i.p.)により麻酔を行った。椎弓切除を、頸部、胸部または腰部レベルで行い、および背部脊髄(dorsalfuniculus)を顕微手術用のハサミを用いて切断する。同じ日に傷害を行い、幹細胞の増殖を阻害する調節因子を含む組成物を、30ゲージのカニューレがついた100  $\mu$ lの容量の浸透圧ミニポンプ(ALZA、分配速度: 0.5  $\mu$ l/h/7日; モデル1007D)を用いて第4の脳室内に注入した。定位固定を用いてカニューレを、人字縫合および十字縫合の間の頭蓋骨位置を伴う第4脳室内のAP-6.0 mm後方から

ブレグマ、L-0.3 mmおよびDV-4.3 mm下方硬膜へ移植した。カニューレを歯科用アクリルセメントにより固定した。傷害刺激にตอบสนองして幹細胞増殖を阻害する調節因子を含む組成物を、流速0.5  $\mu$ l/hで1~28日間注入した。組成物は0.9%生理食塩水、1 mg/mlのマウス血清アルブミン(シグマ)およびBMP-2を10 ng/mlの濃度で含む。他の使用できる調節因子としてはCNTF、レチノイン酸、TGF- $\beta$ およびMIP族のメンバー、およびEGFおよびFGFに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのようなインビトロにおける神経幹細胞増殖における阻害活性を有することが見いだされたものが挙げられる。傷害を受けた部位の細胞の応答を実施例7に述べた方法に従い測定した。

#### B: 脳傷害

成体ヒト雄CD1マウス(チャールズリバー-St. コンスタント、ケベック)を、ペントバルビタールナトリウム塩(80 mg/kg、i.p.)により麻酔を行った。

頭蓋骨の小部位を除去して、大脳皮質領域に接触させた。Cavanagh, J.B. J. Anatomy 106: 471-487(1970)に従い、切除傷害を皮質内で生じさせた。同日に、傷害を起こし、幹細胞増殖を阻害する因子を30ゲージのカニューレを有する100  $\mu$ lの容量の浸透圧ミニポンプ(ALZA、分配速度: 0.5  $\mu$ l/h/7日; モデル1007D)を用いて同側室内に注入した。定位固定を用いてカニューレを移植した。カニューレを歯科用アクリルセメントにより固定した。傷害刺激にตอบสนองする幹細胞増殖を阻害する調節因子を、流速0.5  $\mu$ l/hで1~28日間注入した。ビヒクル溶液は1 mg/mlのマウス血清アルブミン(シグマ)を含む0.9%生理食塩水である。

阻害因子としてはONTF、レチノイン酸、TGF- $\beta$ およびMIP族のメンバー、およびEGFおよびFGFに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのようなインビトロにおける神経幹細胞増殖における阻害活性を有することが見いだされたものが挙げられる。傷害を受けた部位の細胞の応答を実施例7に述べた方法に従い測定した。

#### 実施例7

##### CNSの傷害部位における増殖細胞の検出

実施例6の注入期間の後に続き、マウスにブロモデオキシウリジン (BrdU; シ

グマ、120mg/kg、i.p.) を2時間毎に、計5回注射を行って傷害を受けた部位のラベルを行った。動物を最終注入から30分後、2日後、4日後、1週間後、6週間後または6カ月後に、それぞれ、過剰の麻酔を行うことにより犠牲にし、4%のバラホルムアルデヒドと共に灌流する。傷害部位を含む、近接した領域および傷害部位に近接した脳室部位を除去し、灌流液中で、4℃において一晚ポストフィックス(postfix)を行い、凍結保護を行う。30 $\mu$ m矢状の低温槽部分をカットして、直接ゲル化したスライド上に張りつける。BrdU検出のために、その部位を1MのHClで、65℃30分間処理を行って細胞性DNAを変性させた後に、組織を免疫細胞化学的に処置を行う。ラットアンチ-BrdU (セララブ) をロバアンチ-ラット-FITCと共に免疫細胞化学的処置に使用する。GFAP (アストロサイトにより表現される) に対する血清を使用し、次にロバアンチ-ラット-FITCを使用してGFAP発現およびグリア瘢痕生産物を視覚化する。ネスチン発現における効果を、ネスチンに対する抗血清および続いてロバアンチ-ラット-FITCによりラベル化を行うことにより定量化し、脳室および傷害部位に近いネスチン免疫応答性細胞の数を計測する。免疫染色の特異性は、一次抗体が存在しないことにより確認する。処置動物の得られた結果を、ビヒクルのみを脳室内治療として投与されたコントロールと比較する。

全てここに挙げた文献をここに参考文献として引用する。

表 1

増殖因子											
EGF			bFGF			EGF+bFGF			bFGF+ヘパラン		
									EGF+bFGF+ヘパラン		
調節因子											
	#	サイズ	#	サイズ	#	サイズ	#	サイズ	#	サイズ	サイズ
TGFβ1 族	.57%	-	.57%	-	.34%	-	.34%	-	.20%	-	.
BMP-2	.100%	n/a	.5%	=	.16%	-	.16%	-	.10%	-	.
インターロイキン	.21%	=	.23%	=	.37%	-	.37%	-	.39%	-	.
MIP 族	.25%	=	.6%	=	.32%	-	.32%	-	.33%	-	.
NGF	.10%	=	.0%	=	.30%	-	.30%	-	.48%	-	.
PDGF	.15%	=	.4%	=	.26%	-	.26%	-	.27%	-	.
TNFα	.17%	=	.17%	=	.41%	-	.41%	-	.37%	-	.
10 <sup>-6</sup> M レチノイン酸	.8%	=	.61%	=	.31%	-	.31%	-	.45%	-	.
CNTF	.23%	=	.77%	=	.81%	-	.81%	-	.84%	-	.
EGF	.	=	.14%	=	.0%	-	.0%	-	.	-	.
ヘパラン硫酸	.0%	=	.0%	=	.0%	-	.0%	-	.	-	.

◆ BMP-2を除く (i.e. TGF α およびアクチビン)

増殖される神経球体の数 (n) は、調節因子存在下に増殖因子に反応した、1 ユニットの神経球体の減少 (-) および増加 (+) を反映した割合 (%) で表されている (調節因子の存在下に増殖した神経球体数と比較)。

増殖因子および調節因子存在下に増殖される神経球体のサイズを、増殖因子存在下において測定されるものと比較して、以下のように示す。

++ : 非常に大きい ; + : 大きい ; = : ほぼ同じサイズ ; ~ : サイズが変

【図1】

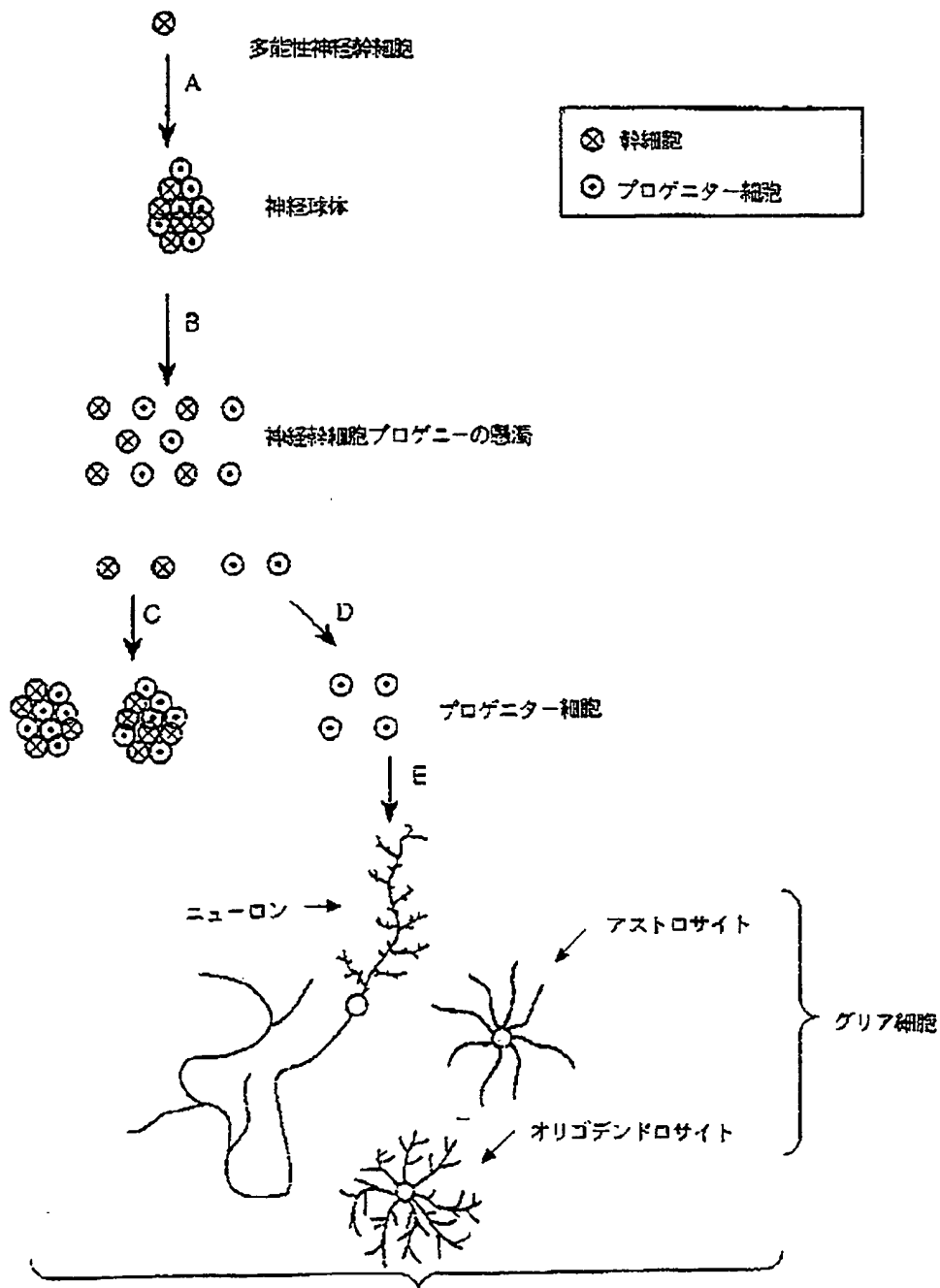
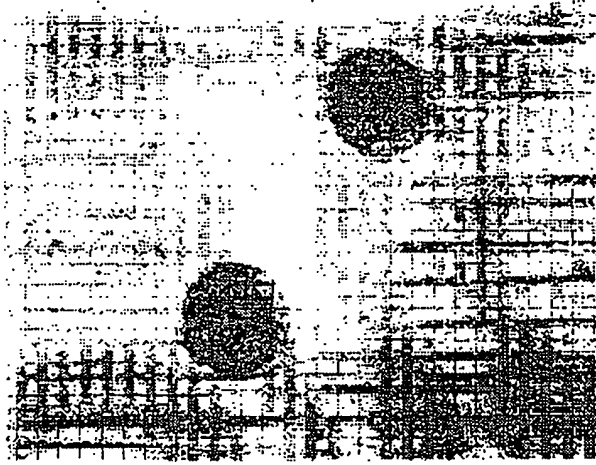


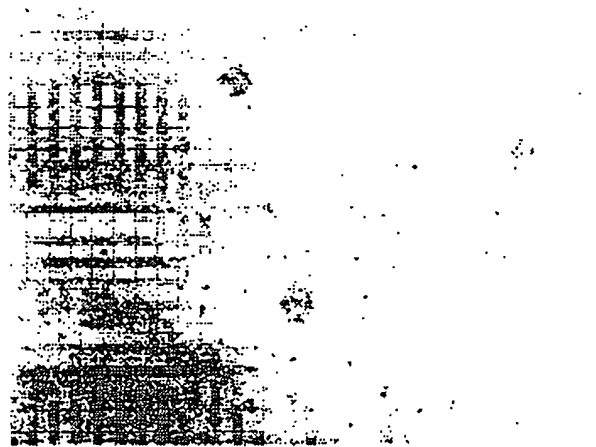
FIG. 1

【図2】

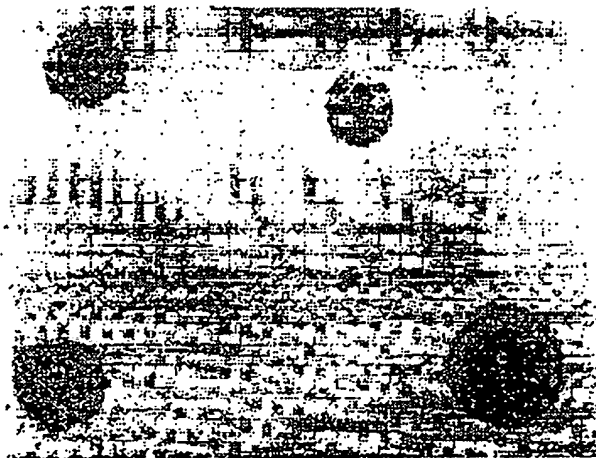
**FIG.\_2A**



**FIG.\_2B**



**FIG.\_2C**



【図3】

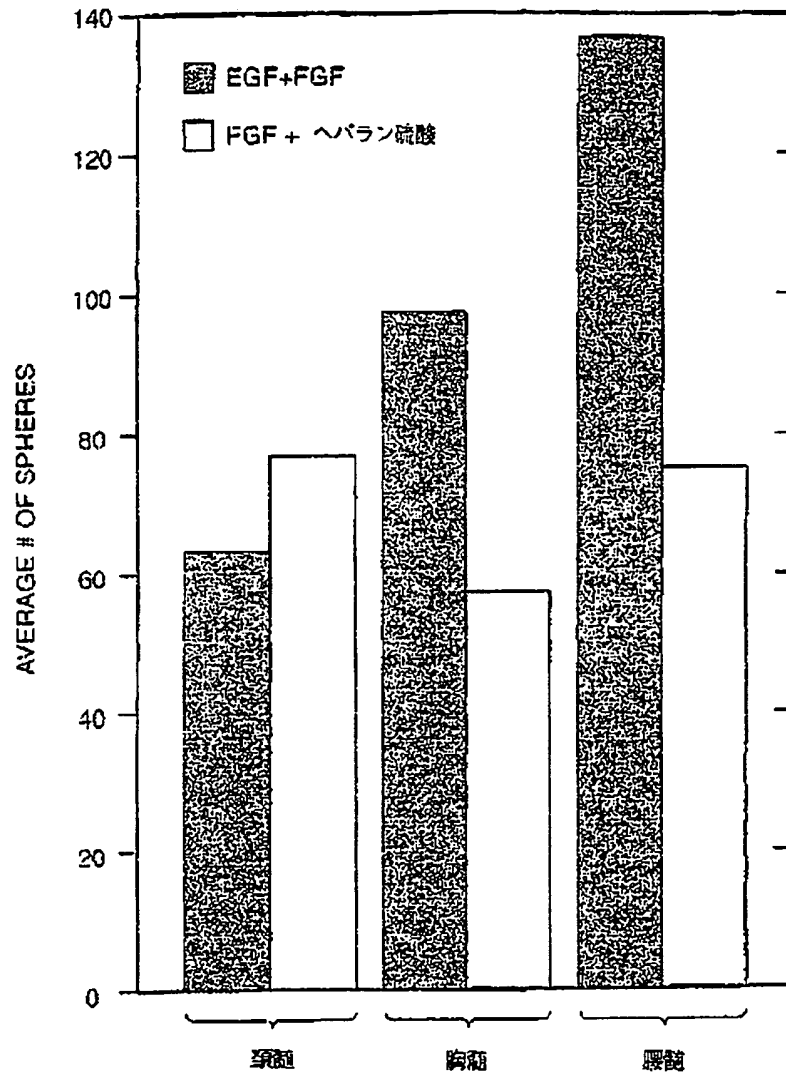


FIG. 3

脊髄領域

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International App. No.  
PCT/CA 95/08637

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12H5/06 C12H5/08 A61K38/18 A61K31/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Extensive data base consulted during the international search (name of data base used, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
X	WO,A,94 10292 (NEUROSPHERES LTD) 11 May 1994 see page 8, line 24 - page 14, line 32 ---	1-4,6-10
X	WO,A,94 03199 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 17 February 1994 see page 13, line 13 - page 16, line 10 ---	1-4,7-10
X	SCIENCE, vol. 260, 2 April 1993 LANCASTER, PA US, pages 103-106. VICTOR NUROOMBE ET AL. 'DEVELOPMENTAL REGULATION OF NEURAL RESPONSE TO FGF-1 AND FGF-2 BY HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN.' see the whole document ---	1-5
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier documents (unpublished or as after the international filing date) "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the prior art of a particular invention or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date of the invention "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understate the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 April 1996		Date of mailing of the international search report 23. 04. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1211 Patentstrasse 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2015, Tx. 31 651 qpo nl, Fax (+31-70) 340-2016		Authorized officer Reamp, 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Ap. No.  
PCT/CA 95/08637

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 42, 20 October 1995 MD US, pages 24941-24948, YARDENAH G. BRICKMAN ET AL. 'HEPARAN SULFATES MEDIATE THE BINDING OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR TO A SPECIFIC RECEPTOR ON NEURAL PRECURSOR CELLS.' see the whole document	1-5
Y	US, A, 5 175 103 (VIRGINIA LEE ET AL.) 29 December 1992 see column 2, line 55 - column 3, line 2	1, 4, 7-10
Y	WO, A, 94 09119 (NEUROSPHERES LTD) 28 April 1994 see page 8, line 4 - page 9, line 29; example 1	1, 2, 4, 6-10
Y	WO, A, 94 16718 (NEUROSPHERES LTD) 4 August 1994 see page 9, line 10 - page 10, line 28; example 1	1, 2, 4, 6-10
A	WO, A, 89 12464 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 28 December 1989	



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor: application No.

PCT/CA95/00637

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos. 15  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although this claim is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not require payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor: A patent family member

International Ap. No.

PCT/CA 95/06637

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9410292	11-05-94	AU-B- 5367694	24-05-94
		EP-A- 8669973	06-09-95
		FI-A- 952022	27-04-95
		NO-A- 951617	27-04-95
		WO-A- 9416718	04-08-94
WO-A-9403199	17-02-94	AU-B- 4995193	03-03-94
		ZA-A- 9305648	29-08-94
US-A-5175103	29-12-92	CA-A- 2128730	29-04-93
		EP-A- 0628847	26-10-94
		JP-T- 7502645	23-03-95
		WO-A- 9308266	29-04-93
WO-A-9409119	28-04-94	AU-B- 5147493	09-05-94
		CA-A- 2147162	28-04-94
		EP-A- 0664832	02-08-95
		FI-A- 951677	07-04-95
		NO-A- 951378	07-04-95
		WO-A- 9416718	04-08-94
WO-A-9416718	04-08-94	AU-B- 6698394	15-08-94
		CA-A- 2155024	04-08-94
		EP-A- 0681477	15-11-95
		FI-A- 953569	25-09-95
		NO-A- 952985	27-07-95
		AU-B- 665912	14-12-95
		AU-B- 2242552	11-02-93
		CA-A- 2113118	21-01-93
		NO-A- 9301275	21-01-93
		EP-A- 0594659	04-05-94
		FI-A- 935929	02-02-94
		JP-T- 6509225	20-10-94
		NO-A- 940055	03-03-94
		AU-B- 5147493	09-05-94
		CA-A- 2147162	28-04-94
		WO-A- 9409119	28-04-94
		EP-A- 0664832	02-08-95
		FI-A- 951677	07-04-95
		NO-A- 951378	07-04-95

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Informal in patent family member

 International Application No.  
**PCT/CA 95/00637**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9416718		AU-B- 5367694	24-05-94
		WO-A- 9418292	11-05-94
		EP-A- 0669973	06-09-95
		FI-A- 952022	27-04-95
		NO-A- 951617	27-04-95
WO-A-8912464	28-12-89	US-A- 5100668	31-03-92

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 レイノルズ ブレント エイ  
カナダ アルバータ ティ2エヌ 1エック  
ス9 カルガリー ノースウェスト エ  
イ ストリート 235-11

IS. 核膜因子が細胞核内の領域を阻害すると、近接の経路第 11 項または第 12

項に記載の組成物。

14. 滅菌剤下が、BQ-8、CMT、レチノイン酸、BQ-9およびBQ-10の混合物、並びにBQ-8およびBQ-9と抗体に対するアンチセンスオリゴデオキシトリフェノイドからなる群から選択されると、請求の範囲第13項に記載の組成物。

15. 滅菌剤下がBQ-2である、請求の範囲第14項に記載の組成物。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**